

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-293920

(43)Date of publication of application : 24.12.1986

(51)Int.Cl. A61K 35/74

(21)Application number : 60-135979 (71)Applicant : IDEMITSU KOSAN CO LTD

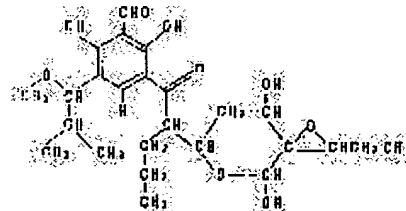
(22)Date of filing : 24.06.1985 (72)Inventor : TSUJI KIMIYOSHI
KADOTA AKIHIKO
ITO ASAMI

(54) IMMUNO-SUPPRESSING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: An immuno-suppressing agent containing SI-4228 substance as an active component.

CONSTITUTION: The objective immuno-suppressing agent can be produced by using the SI-4228 substance of formula as an active component. The substance has the following properties. Elemental analysis, C 62.1%, H 7.4%, O 30.5%; molecular weight, 480 (vapor-pressure method using chloroform as the solvent); specific rotation, $[\alpha]D21=+54$ (C=0.1, methanol); solubility, soluble in methanol, ethanol, etc., insoluble in water and n-hexane; nature, neutral; color reactions, positive to ferric chloride and 2,4-dinitrophenylhydrazine and negative to ninhydrin; melting point, 114W116°C; appearance, white acicular crystal. It is administered in the form of pill, tablet, granule, powder, capsule, syrup, ointment, injection, etc., at a dose of 0.1W10mg/kg daily, preferably 0.5W5mg/kg daily. It is effective for the remedy or prevention of autoimmune diseases, allergic diseases, immunoproliferative syndrome, etc.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑯日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A) 昭61-293920

⑬Int.Cl.⁴
A 61 K 35/74

識別記号
A B C

厅内整理番号
7138-4C

⑭公開 昭和61年(1986)12月24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮発明の名称 免疫抑制剤

⑯特願 昭60-135979

⑰出願 昭60(1985)6月24日

⑱発明者 辻 公美 横浜市旭区川島町3050番地の139

⑲発明者 門田 明彦 市原市山田橋766番地1

⑳発明者 伊藤 朝美 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地

㉑出願人 出光興産株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

㉒代理人 弁理士 久保田 藤郎

明 索引

1. 発明の名称

免疫抑制剤

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の性質を有する S I - 4 2 2 8 物質を
有効成分とする免疫抑制剤。

(イ) 元素分析値 C : 62.1 %, H : 7.4 %,
O : 30.5 %

(ロ) 分子量 480 (蒸気圧法による、溶媒:
クロロホルム)

(ハ) 赤外線吸収スペクトル 第1図に示す通
りである

(ニ) 紫外線吸収スペクトル 第2図に示す通
りである

(ホ) 核磁気共鳴スペクトル 第3図に示す通
りである

(ヘ) 比旋光度 $(\alpha)_D^{25} = +54$ (C = 0.1,
メタノール)

(ト) 溶解性 メタノール, エタノール, アセ
トン, 酢酸エチル, ベンゼン,

エーテル, クロロホルム, 四塩
化炭素に可溶、水, n-ヘキサ
ンに不溶

(チ) 中性 (電気泳動法による)

(リ) 呈色反応 塩化第二鉄, 2,4-ジニトロ
フェニルヒドラジンに陽性、
ニンヒドリンに陰性

(ヌ) 融点 114 ~ 116 ℃

(ル) 物質の色 白色針状結晶

(2) 細胞性免疫抑制剤である特許請求の範囲第
1項記載の免疫抑制剤。

(3) 体液性免疫抑制剤である特許請求の範囲第
1項記載の免疫抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は免疫抑制剤に関し、詳しくは S I -
4 2 2 8 物質を有効成分とする免疫抑制剤に関する。

(従来技術及び発明が解決しようとする問題点)
従来より免疫抑制作用を発現する物質として様

様なものが知られているが、既知の物質には化学合成品が多く、副作用を惹起することがあった。また、適用しうる免疫疾患が限られている等の問題もあった。

(問題点を解決するための手段)

抗生素質 S I - 4 2 2 8 物質は農業用殺菌剤として有用であることが開示されている（特開昭 58-116686号）。

本発明者らは、この S I - 4 2 2 8 物質について動物における各種の生理学的実験を行った結果、免疫抑制作用を有していることを見出し、本物質は上記問題点を解消するものであることを知見して本発明を完成したのである。

すなわち本発明は、下記の性質を有する S I - 4 2 2 8 物質を有効成分とする免疫抑制剤を提供するものである。

(イ) 元素分析値 C : 62.1%, H : 7.4%, O : 30.5%

(ロ) 分子量 480 (蒸気圧法による、溶媒: クロロホルム)

トミセス・エスピー (*Streptomyces sp.*) S I - 4 2 2 8 株 (FERM P-6198) を培養することによって製造することができ、その詳細は前記特開昭 58-116686号公報に記載されている。

S I - 4 2 2 8 物質は様々な免疫抑制作用を有しており、たとえば T リンパ球増殖抑制、移植免疫抑制、遅延型炎症反応抑制などの細胞性免疫に関する作用や抗体産生抑制などの体液性免疫に関する作用を有している。

本発明の免疫抑制剤は S I - 4 2 2 8 物質を有効成分とするものであり、該物質を単独で用いてもよいが、通常は常用の補助的成分、たとえば賦形剤等と一緒に用い、丸剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤、軟膏、塗布剤、注射剤などの形態として使用される。この場合に用いられる賦形剤としては、例えば丸剤にはカンゾウ、澱粉など、錠剤には乳糖、澱粉、カルボキシメチルセルロースなど、散剤には澱粉、乳糖、白糖などがある。

(ハ) 赤外線吸収スペクトル 第1図に示す通りである

(ニ) 紫外線吸収スペクトル 第2図に示す通りである

(ホ) 核磁気共鳴スペクトル 第3図に示す通りである

(ヘ) 比旋光度 $(\alpha)^{D}_{25} = +5.4$ (C = 0.1, メタノール)

(ト) 溶解性 メタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ベンゼン、エーテル、クロロホルム、四塩化炭素に可溶、水、n-ヘキサンに不溶

(チ) 中性 (電気泳動法による)

(リ) 呈色反応 塩化第二鉄、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンに陽性、ニンヒドリンに陰性

(ヌ) 融点 114~116℃

(ル) 物質の色 白色針状結晶

上記 S I - 4 2 2 8 物質は、たとえばストレプ

また、本発明の免疫抑制剤は S I - 4 2 2 8 物質のほかに他の免疫抑制剤、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗生素質、ホルモン剤等を適宜配合することができる。

本発明の免疫抑制剤は S I - 4 2 2 8 物質を体重 1 kgあたり 0.1~1.0 mg/日、好ましくは 0.5~5 mg/日の割合で投与すればよく、それにより自己免疫疾患、アレルギー疾患、免疫増殖症候群、臓器移植時の拒絶反応等を治療または予防することができる。

(発明の効果)

このように、本発明の免疫抑制剤は種々の免疫抑制作用を発現でき、免疫抑制療法に有用である。

(実施例)

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

試験例 1

本物質のリンパ球の生存率に及ぼす影響
ヘパリン加ヒト末梢血を Conray 400-Ficoll (比重 1.077) に重層し、1500回転で 30 分間遠心分離後、リンパ球層を分離した。これを

RPMI 1640 培地（「組織培養」、中井準之助ら編集、朝倉書店、第9～11頁（1976年）参照）で3回洗浄後、 5×10^6 個を 1 ml のRPMI 1640 培地-40%ヒト血清中に懸濁させた。

一方、1mgのSI-4228物質を 0.1 ml のエタノールに溶解し、それに 0.05 ml の界面活性剤（Tween 80）を加え、さらにRPMI 1640 培地を加えて全体を 5 ml とした。この 1 ml （SI-4228物質を $0.2 \text{ mg}/\text{ml}$ 含む）を先のリンパ球液 1 ml と混合した。

5%炭酸ガス、95%空気の条件下、37℃で3日間培養し、経時的に細胞の生存率を調べた。測定法はトリパンブルーを用いるdye exclusion法で、顕微鏡下でトリパンブルーに染まる細胞を計測し、その生存率を計算した。なお、対照実験として、SI-4228物質を含まない実験系について同様にしてその生存率を計算した。結果を第1表に示す。

培養終了24時間前に $1 \mu \text{Ci}$ の(^3H)チミジンを加え、培養終了時にセルハーベスター（フローラボラトリー社製）を使ってリンパ球を回収した。

回収されたリンパ球に取込まれた(^3H)チミジンの放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、無添加時の取込量に対する取込率を表わした。結果を第2表に示す。

$$\text{取込率} = \frac{\text{添加時の CPM} - \text{空試験時の CPM}}{\text{無添加時の CPM} - \text{空試験時の CPM}} \times 100$$

第 2 表

SI-4228 物質添加量 ($\mu \text{g}/\text{ml}$)	取込率 (%)
0	100
10	47
50	4
100	1

第 1 表

	生 存 率 (%)	
	SI-4228 物質添加 ($0.1 \text{ mg}/\text{ml}$)	無 添加
培養開始時	100	100
1日後	96	96
2日後	95	96
3日後	95	95

実施例 1

ヒトリンパ球増殖抑制実験（PHA法）

試験例1の方法で分離したリンパ球 5×10^6 個をリンパ球増殖物質としてのPHAを $40 \mu \text{g}/\text{ml}$ 含むRPMI 1640 培地-40%ヒト血清（最終容量 0.1 ml ）に懸濁した。さらに、RPMI 1640 培地に溶解したSI-4228物質の溶液 0.1 ml （調製法は試験例1に準拠）を混合し（本物質の最終濃度を $0, 10, 50, 100 \mu \text{g}/\text{ml}$ とした。）、5%炭酸ガス、95%空気の条件下、37℃で3日間培養した。

上記の表から明らかなように、SI-4228物質の添加量が多くなるにつれてチミジンの取込率が下がって行き、増殖が抑えられていることがわかる。

実施例 2

マウス脾細胞増殖抑制試験

マウス脾細胞増殖抑制試験をJanossyとGreavesによるリンパ球刺激試験（Clin. exp. Immunol. (1971) 9, 483～498）に従って実施した。

マウス（BALB/C）の脾細胞 5×10^6 個をコンカナバリンA $5 \mu \text{g}/\text{ml}$ を含むRPMI 1640 培地-10%牛胎児血清（最終容量 0.1 ml ）に懸濁した。さらに、RPMI 1640 培地に溶解したSI-4228物質の溶液 0.1 ml （調製法は試験例1に準拠）を混合した（SI-4228物質の濃度を最終的に $0, 1, 5, 10 \mu \text{g}/\text{ml}$ とした。）。

5%炭酸ガス、95%空気の条件下、37℃で3日間培養した。培養終了24時間前に $1 \mu \text{Ci}$

の(³H)チミジンを加え、培養終了時にセルハーベスターを使用してリンパ球を回収した。以下、実施例2と同様にして放射能を測定し、取込率を計算した。結果を第3表に示す。

第 3 表

SI - 4228 物質添加量 (μ g/mℓ)	取込率 (%)
0	100
1	92
5	38
10	12

実施例3

マウス皮膚移植片の生着に対する効果

D B A / 2 系雄マウスの腹部より得た皮膚(円形 8 mm 径)を B A L B / C 系雄マウスの背部に移植し、移植片の 50%が拒絶されるまでの日数を記録した[「移植」第1巻、43~55頁(1966年)、皮膚移植の手技と成績判定(藤井源七郎、鈴木正明)に準拠]。

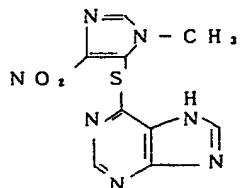
試験は1群を5匹とし、S I - 4228 物質を投与した群(2.5 mg/kg/日、経口)、対照薬アザチオプリン投与群(100 mg/kg/日、経口)および無投与群を比較検討した。なお、薬物の投与は移植前3日より連日実施した。結果を第4表に示す。



第 4 表

	投与量/日	移植片の生着日数	平均日数
無投与群	0	8, 9, 10, 10, 11	9.6
マザチオプリン投与群*	100 mg/kg	10, 11, 12, 13, 13	11.8
S I - 4228 物質投与群	2.5 mg/kg	14, 15, 16, 19, 21	17.0

*マザチオプリンは次式の構造を有し、免疫抑制剤として知られている。



試験例 2

マウスに対する S I - 4 2 2 8 物質の急性毒性
 体重 22 ~ 25 g の I C R 系雄マウス 10 匹を
 1 群として用い、 S I - 4 2 2 8 物質を 0.5 %
 Tween - 8 0 に懸濁し、経口投与を行った。1 週
 間経過後の死亡率から LD₅₀ を算出した。その結
 果 LD₅₀ は 50 mg / kg であった。

4. 図面の簡単な説明

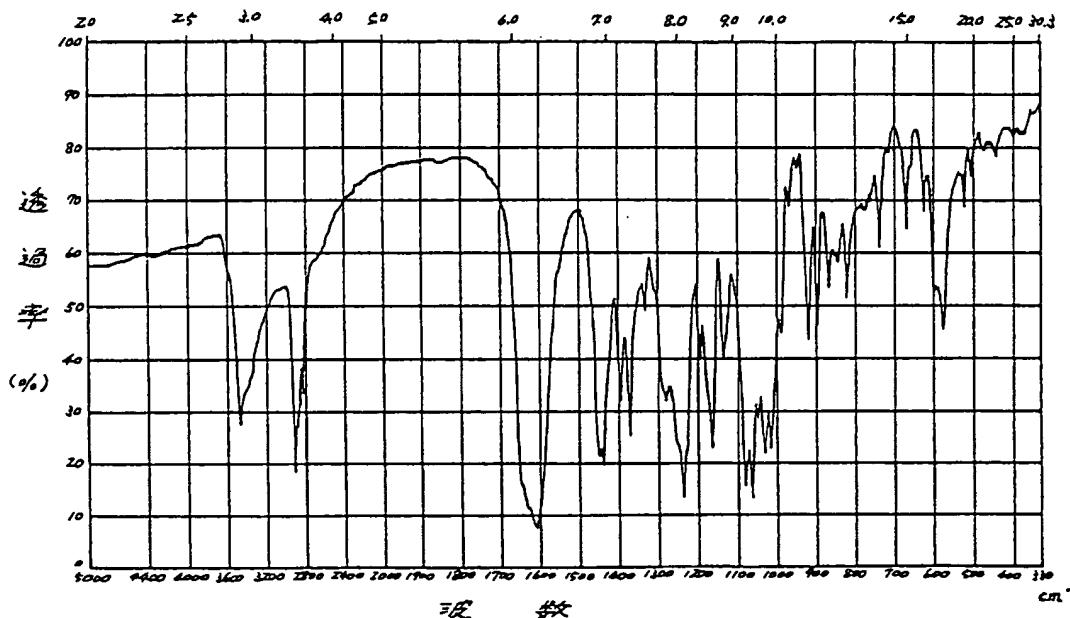
第 1 図は S I - 4 2 2 8 物質の赤外線吸収スペ
 クトル、第 2 図は該物質の紫外線吸収スペクトル、
 第 3 図は該物質の核磁気共鳴スペクトルをそれぞ
 れ示す。

特許出願人 出光興産株式会社

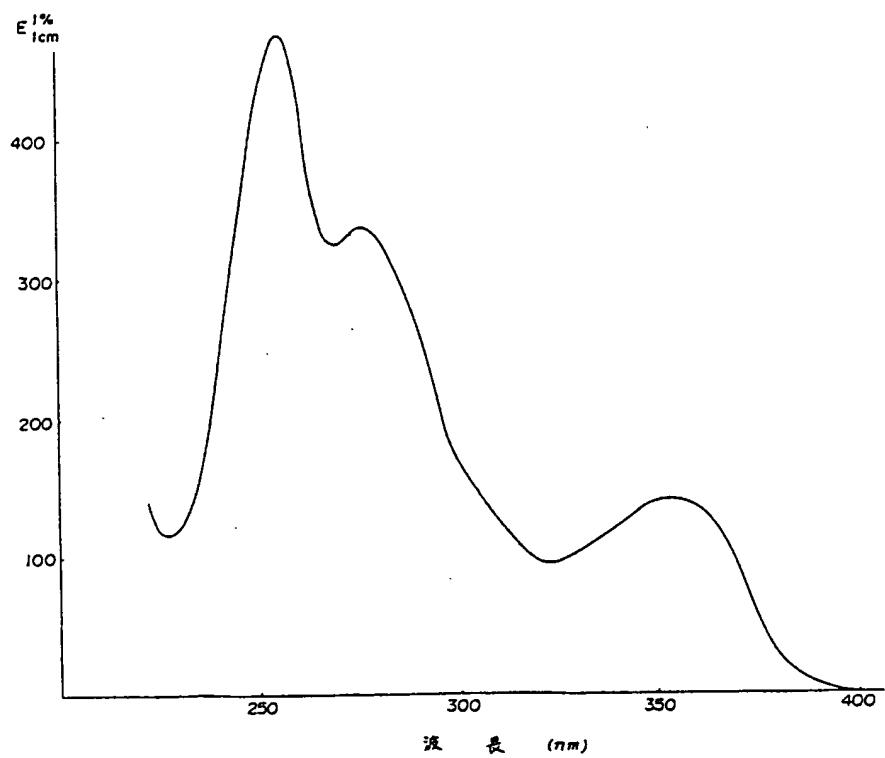
代理人 弁理士 久保田 藤 郎



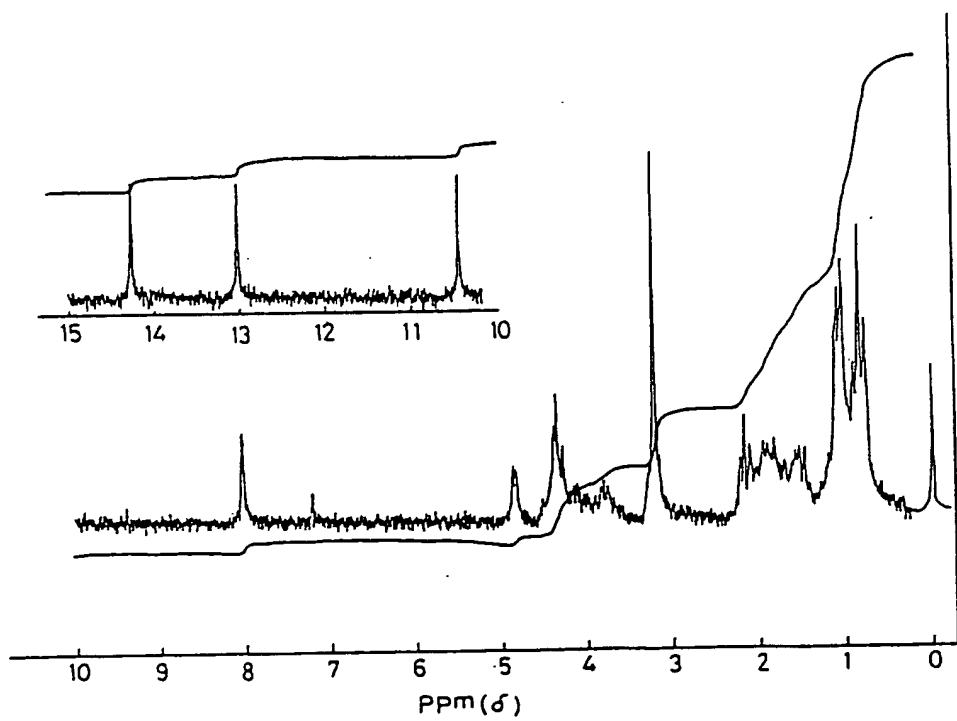
第 1 図



第2図



第3図



手続補正書(自発)

昭和60年7月17日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年6月24日付提出の特許願

2. 発明の名称

免疫抑制剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

出光興産株式会社

4. 代理人

⑦104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勘ビル5階

(7407)弁理士 久保田 蔡 郎

電話(275)0721番

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

特許庁
60.7.17

第5表 緩羊赤血球に対する抗体產生細胞数

(脾臓中の総個数)

無投与群	5.7, 6.6, 6.7, 7.3, 8.4×10^4 (平均値 6.9×10^4)
SI-4228物質投与群	3.8, 4.0, 4.2, 4.4, 4.5×10^4 (平均値 4.2×10^4)

実施例5

炎症抑制に対する効果

ウイスター系雌ラットの左後肢にフロイント補助液(Difico製)0.1mlを皮下注射し4日、8日、12日後の足蹠容積を容積測定器(ユニコム社製、TK-101型)で測定した。右後肢足蹠容積に対する容積増加率をSI-4228物質を同時に投与した場合と無投与動物の場合とて比較を行った。

試験は1群5匹とし、SI-4228物質の投

6. 補正の内容

(1) 明細書第13頁第4表中、最左欄中段の「マザチオプリン投与群」を「アザチオプリン投与群」に訂正する。

(2) 同第14頁の試験例2の前に次の実施例を加入する。

「実施例4

体液性免疫抑制に対する効果

綱羊赤血球1.0vol%を含む生理食塩水0.3ml/匹腹腔内投与により感作したC57BL/6系雌マウスにSI-4228物質を投与し、綱羊赤血球に対する抗体產生能をSI-4228物質無投与マウスの抗体產生能と比較した。抗体產生能の測定は、感作5日後のマウス脾細胞中の抗体產生細胞数をゲルの局部的溶血反応(Jerne & Nordin; Science, Vol 140, P-405 (1963))で測定することにより行った。

試験は1群を5匹とし、SI-4228物質は感作翌日に6.7mg/kgを1回経口投与した。結果を第5表に示す。

与を1mg/kg/日および2.5mg/kg/日(それぞれ8日間経口投与)で実施した。結果を第6表に示す。

第6表

SI-4228物質の投与量	4日目	8日目	12日目
2.5mg/kg/日	125	123	120
1.0mg/kg/日	139	132	131
無投与群	144	142	141

右足蹠容積を100とした時の左足蹠容積(5匹の平均値)

(以上)

手続補正書(自発)

昭和60年10月15日

特許庁長官 宇賀道郎殿

1. 事件の表示

特願昭60-135979

2. 発明の名称

免疫抑制剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

出光興産株式会社

4. 代理人

〒104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勘ビル5階

(7407)弁理士久保田藤郎

電話(275)0721番

5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の

(以上)

詳細な説明の欄

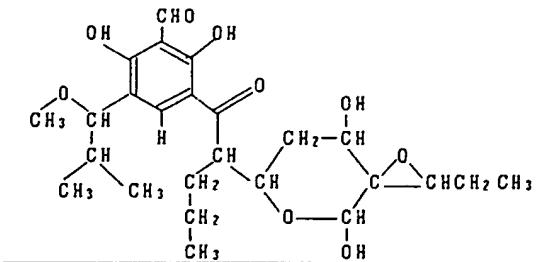
6. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙の如く訂正する。

特許庁
60.10.15

特許請求の範囲

(1) 下記の構造式を有する 2-エチル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンを有効成分とする免疫抑制剤。

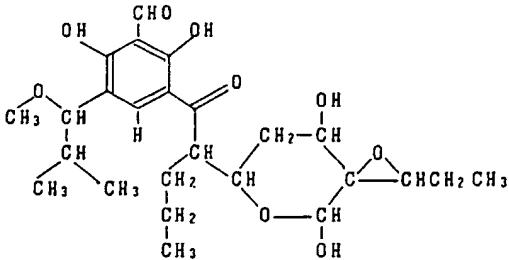


(2) 細胞性免疫抑制剤である特許請求の範囲第1項記載の免疫抑制剤。

(3) 体液性免疫抑制剤である特許請求の範囲第1項記載の免疫抑制剤。

(2) 明細書第4頁18行目と20行目の間に次の文を加入する。

「上記SI-4228物質は下記の構造式



を有し、その化合物名は 2-エチル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。」



特許庁
60.10.15